

MEASUREMENT OF ENZYME INHIBITOR

[71] Applicant: INTERNATL REAGENTS

[72] Inventors: MATOBA KATSUMOTO;
HIURA HISAHIDE

[21] Application No.: JP04356716

[22] Filed: 19921222

[43] Published: 19940705

[No drawing]

[Go to Fulltext](#)

[57] Abstract:

PURPOSE: To provide a measurement of enzyme inhibitors such as antitronbin III used in a field of clinical inspection. CONSTITUTION: A method of measuring an enzyme inhibitor by subjecting an objective enzyme inhibitor to reaction with an excessive enzyme and measuring the residual enzyme. The second enzyme inhibitor, which is an inhibitor against the enzyme and different from the objective enzyme inhibitor, or an inhibitor against the objective enzyme inhibitor is added to the reaction system. This method can measure the enzyme inhibitor without diluting the sample, is excellent in the operation, can carry out the measurement easily and rapidly and has an effect of applicable to an automatic analysis.

[51] Int'l Class: C12Q00100

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-181798

(43)公開日 平成6年(1994)7月5日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/00	Z	6807-4B		
1/37		6807-4B		
1/56		6807-4B		
G 0 1 N 33/50		7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数4(全5頁)

(21)出願番号	特願平4-356716	(71)出願人	000170565 国際試薬株式会社 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号
(22)出願日	平成4年(1992)12月22日	(72)発明者	的場 功始 神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(72)発明者	日裏 久英 神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内
		(74)代理人	弁理士 廣瀬 孝美

(54)【発明の名称】 酵素阻害物質の測定法

(57)【要約】

【目的】 臨床検査などの分野で使用され、アンチトロピン-IIIなどの酵素阻害物質の測定法を提供することを目的とする。

【構成】 本発明は、測定対象である酵素阻害物質と過剰の酵素とを反応させ、残存する酵素を測定することにより酵素阻害物質を測定する方法であって、反応系に当該酵素に対する阻害物質であって且つ測定対象である酵素阻害物質とは異なる第2の酵素阻害物質、又は測定対象である酵素阻害物質に対する阻害物質を添加することからなる。本発明の方法によれば、検体を希釈することなく酵素阻害物質を測定することができるので、操作性に優れ、簡便且つ迅速に測定を行うことができ、自動分析にも適用することができるという効果を奏する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 測定対象である酵素阻害物質と過剰の酵素とを反応させ、残存する酵素を測定することにより酵素阻害物質を測定する方法において、反応系に当該酵素に対する阻害物質であって且つ測定対象である酵素阻害物質とは異なる第2の酵素阻害物質、又は測定対象である酵素阻害物質に対する阻害物質を添加することを特徴とする酵素阻害物質の測定法。

【請求項2】 測定対象である酵素阻害物質と酵素との反応後、第2の酵素阻害物質を添加し、残存酵素を測定する請求項1記載の酵素阻害物質の測定法。

【請求項3】 測定対象である酵素阻害物質に対する阻害物質により当該酵素阻害物質を低減させて酵素と反応させ、残存酵素を測定する請求項1記載の酵素阻害物質の測定法。

【請求項4】 測定対象である酵素阻害物質が、アンチトロンビン-III、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -アンチキモトリプシン又は α_2 -プラスミンインヒビターである請求項1から3のいずれかに記載の酵素阻害物質の測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は酵素阻害物質の測定法に関し、より詳細には、臨床検査などの分野で利用され、操作性、測定精度などを改善した酵素阻害物質の測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】生体内における酵素反応は、その活性化物質や反応を阻害する阻害物質により巧妙に制御・調整され、機能の調節が図られている。例えば、血液凝固機構においては、血管損傷部位以外での血液凝固反応や、過度の凝固亢進・線溶亢進を阻害する酵素阻害物質が存在し、これにより血液凝固・線溶の制御・調節が行われている。血栓形成の進展状態を検査する凝血学的検査においては酵素阻害物質の測定は重要であり、凝固・線溶の状態を示すよい指標となることから、アンチトロンビン-III（以下、AT-IIIという）、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -アンチキモトリプシン、 α_2 -プラスミンインヒビターなどの酵素阻害物質の測定が行われている。特に、AT-IIIの測定は重要であり、肝硬変、急性・慢性肝炎等の肝疾患、動脈硬化症、循環器疾患、広汎性血管内凝固(DIC)などの診断に用いられる。このような酵素阻害物質の測定法（定量法）としては、測定対象である酵素阻害物質と過剰の酵素とを反応させ、残存する酵素を測定することにより酵素阻害物質を測定することが行われている。例えば、生体試料（検体）中のAT-IIIを測定する場合には、AT-IIIが酵素トロンビンを阻害することを利用して、一定量のトロンビンを検体中のAT-IIIと反応させ、残存するトロンビンの活性を測定することにより、AT-IIIを測定することが行わ

れている。この際、トロンビン活性の測定は、発色性合成基質の加水分解速度を吸光度変化をもって測定する方法、天然基質であるフィブリノゲンのフィブリンへの転換速度を凝固時間をもって測定する方法などが用いられる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来、上記の方法にて酵素阻害物質が測定されているが、血液検体中には酵素阻害物質が多く含まれており、特にAT-IIIは多量（約25mg/dl）に存在するため、通常の検体量（5～50 μ l）で測定しようとするには検体を希釈する必要がある。検体を希釈する操作は煩雑で、測定の迅速化、簡便化を図る上では、検体を希釈しないで測定できる方が好ましい。しかし、検体を希釈しないで測定しようとするれば、検体量を極端に少なくする必要があるが、一般にサンプリング量が少なくなるにしたがって測定の再現性が低下し、また2 μ l以下のサンプリングは実質的に不可能である。一方、非希釈検体を通常のサンプリング量用いて測定する場合には、酵素（トロンビン）が消費されてしまい、残存トロンビンに基づいて検体中のAT-III量を測定することができない。また、それを回避するためにトロンビンを増加させると、残存トロンビン量が多くなり、残存トロンビンの測定に際して、反応速度が大きくなり過ぎ、前記の合成基質を用いる方法では吸光度が3以上となり測定不可能となった。フィブリノゲン基質を用いる方法においては凝固時間が著しく短くなり測定不能となる。

【0004】図1は、上記の関係を示す概念図である。横軸は検体中のAT-III濃度を示し、縦軸は反応速度（即ち、残存トロンビンと発色性合成基質又はフィブリノゲン基質との反応速度）を示す。図中、Aは理想的な検量線を示す。一方、Bは、酵素量はAと同じにすると共に非希釈検体を用い、検体量を通常のサンプリング量として測定したケースを示し、検体中の総計AT-II I量が多いので、AT-III濃度の低い範囲でトロンビンが消費されてしまい、残存トロンビン活性がなくなり、測定できる範囲が狭くなる。また、Cは、検体量はAと同じにしてトロンビン量を増加させたケースで、残存トロンビン量が多くなるので、測定不可能な反応速度の範囲が生じ、この場合も測定できる範囲が狭くなる。更に、Dは検体量及び酵素量を増加させたケースで、この場合も残存トロンビン量が多くなり、測定できる範囲が狭くなる。このように、酵素阻害物質の測定に際し、測定の操作性、迅速性を改善する上からは検体を希釈しないで測定することが好ましいが、従来の方法においては非希釈検体を用いて測定を行うことは不可能であった。本発明はかかる問題を解決するためになされたもので、検体を希釈することなく酵素阻害物質を測定（定量）できる方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、検体を希釈することなく酵素阻害物質を測定する方法を鋭意研究した結果、残存酵素活性を低減させるか又は酵素阻害物質の活性を低減させることにより、簡便且つ高精度で酵素阻害物質を測定できることを見出して本発明を完成させた。即ち、本発明の酵素阻害物質の測定法は、測定対象である酵素阻害物質と過剰の酵素とを反応させ、残存酵素を測定することにより酵素阻害物質を測定する方法において、反応系に当該酵素に対する阻害物質であって且つ測定対象である酵素阻害物質とは異なる第2の酵素阻害物質、又は測定対象である酵素阻害物質に対する阻害物質を添加することからなる。従来の方法では、図1のAのような検量線を得るために検体を希釈するか、又はB若しくはCの条件において、反応条件を酵素や阻害物質の反応至適条件でない環境で測定する方法が取られていた。この場合には、他の共存するマクログロブリンなどの影響を受ける等、特異性に欠ける測定となる。それに対し、本発明の方法は、非希釈検体を用いながらも、測定可能な範囲が広く、図1のAのような理想的な検量線が得られる測定法を提供するものである。

【0006】本発明の方法は、図1のDのような条件下の反応系において酵素に対する第2の酵素阻害物質を添加して酵素活性を低減させるか（以下、第1の方法という）又は図1のBのような条件下の反応系において測定対象である酵素阻害物質に対する阻害物質を添加して当該酵素阻害物質の活性を低減させる（以下、第2の方法という）ことにより、図1のAのような理想的な検量線を与える条件に修正して、酵素阻害物質の測定を行うものである。

【0007】以下、本発明の方法をより詳細に説明する

が、上記の第1の方法においては、まず図1のDの条件を予め設定しておく。即ち、検体量を増加させても残存する酵素が測定可能な量存在する酵素量を用い、検体中の酵素阻害物質と反応させた後に、第2の酵素阻害物質を添加して残存する酵素活性を低減させて測定する方法である。添加された第2の酵素阻害物質により酵素活性が阻害され、その結果、図1のAの条件が得られるようになる。

【0008】より具体的に、酵素阻害物質AT-IIIを測定する場合をもって説明すると、実際には、通常の方法では酵素活性が大きくなりすぎて、測定できない量のトロンピンを用い、適当な緩衝液（例えば、リン酸緩衝液等）中で、検体中のAT-IIIとトロンピンとを反応させた後、残存トロンピン活性を測定する時に、第2の酵素阻害物質としてトロンピンの阻害物質（例えば、アルガトロバン、ベンザミジン類、DAPA、ヒルジン等）を適当量添加する。これにより、トロンピン活性が減少し、測定可能な範囲を広げることができる。トロンピン活性の測定は、従来の方法と同様に行うことができ、残存トロンピン活性は検体中のAT-III量と逆比例することから、トロンピン活性を測定することにより、検体中のAT-III濃度（活性）が測定できる。このように、第2の酵素阻害物質（トロンピン阻害物質）を使えば、再現性のよいサンプリング容量の検体量で、しかも検体を希釈する必要もなくAT-IIIを測定できる。上記はトロンピンとトロンピン阻害物質を用いるAT-IIIの測定例を示したが、この方法は他の酵素阻害物質にも利用できる。その例を表1に示す。

【0009】

【表1】

表1

測定対象物質	酵素	第2の酵素阻害物質
α_1 -アンチトリプシン	トリプシン	ベンザミジン
α_1 -アンチキモトリプシン	キモトリプシン	ベンザミジン
α_2 -プラスミンインヒビター	プラスミン	アプロチニン
α_2 -マクログロブリン	トロンピン	アルガトロバン

【0010】用いる酵素とその阻害物質（第2の酵素阻害物質）は特に限定されないが、測定対象物質を特異的に測定できる酵素とその阻害物質を組み合わせればよい。なお、使用する酵素及び第2の酵素阻害物質の種類によっては、測定対象の酵素阻害物質と酵素を反応させる際に、第2の酵素阻害物質を共存させることも可能である。

【0011】本発明の第2の測定法は、測定対象である

酵素阻害物質の活性を当該酵素阻害物質の阻害物質により低減させることを要旨とするもので、例えば、図1のBの条件を設定しておいて、測定対象である検体中の酵素阻害物質の阻害活性を、当該酵素阻害物質に対する阻害物質より低減させて測定する方法である。添加された阻害物質により測定対象である酵素阻害物質の活性が阻害され、その結果、図1のAの条件が得られるようになる。より具体的には、例えば、AT-IIIを測定する場

合、適当な緩衝液（例えば、リン酸緩衝液等）中で、検体中のAT-IIIと酵素を反応させる際に、AT-IIIに特異的な阻害物質（例えば、抗AT-III抗体等）を共存させてAT-III活性を低下させる。その結果、AT-III測定に必要な範囲にわたってトロンビン活性が残存するので、図1のAのような条件下に測定を行うことができ、検体を希釈することなくAT-IIIを測定することが可能となる。なお、この際、AT-IIIとその阻害剤を反応させた後に、酵素を反応させてもよい。残存トロンビン活性の測定は、従来の方法と同様にすることができる。AT-IIIなどの測定対象酵素阻害物質の活性を低下させるには、化学物質等を添加する方法や、pH調整剤によるpHの変化によっても可能であるが、この場合には、酵素阻害物質以外の物質に影響されるおそれがある。従って、酵素阻害物質の活性を特異的に低下させることが重要であり、当該酵素阻害物質に対する抗体（モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体）が好適に使用される。

【0012】本発明の方法は、上記で説明した例に限定されるものではなく、適宜変更して実施することができる。測定対象である酵素阻害物質も、血液中の酵素阻害物質に限られるものではなく、種々の酵素阻害物質の測定に本発明の方法は適用することができる。また、測定に際しての反応条件（例えば、反応温度、反応時間、反応系のpH、溶媒等）は、測定対象である酵素阻害物質、酵素、第2の酵素阻害物質、測定対象である酵素阻

第1試薬

トロンビン	1 U/ml
ヘパリン	2 U/ml
N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)- m-トリジン ナトリウム塩(カップラー)	10 mM
50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)	

第2試薬

フェリシアン化カリウム	20 mM
D-フェニルアラニル-プロリル-	
アルギニル-モルホリノアニリン (合成基質)	1 mM
50 mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0)	

【0015】実施例2

検体量を6 μ lとし、第1試薬中のトロンビン濃度を10 U/mlとした他は実施例1と同様に操作し、トロンビン阻害物質であるアルガトロパンを第2試薬中に10 μ g/ml添加若しくは無添加で、実施例1と同様に反応速度を測定し、検体中のAT-III活性(%)と反応速度との関係を求めた。その結果を図3に示す。図中、●は本発明の方法（アルガトロパン添加）による測定結果を、○は従来法（アルガトロパン無添加）による測定結果を示す。図3に示されるように、アルガトロパンを添加しない場合には、残存トロンビン活性が大きく、測定不能の範囲が広いが、アルガトロパンを添加した場合には、検体量を6 μ lとしても図2の検体を希釈した場

害物質に対する阻害物質（抗体等）などの種類により、適宜選択することができる。

【0013】

【発明の効果】以上のように、本発明の方法によれば、検体を希釈することなく酵素阻害物質を測定することができ、しかも高い測定精度が得られる。従って、本発明は操作性に優れ、簡便且つ迅速に酵素阻害物質を測定でき、特に自動分析に好適に使用することができるという効果を奏する。

【0014】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1

下記組成の第1試薬240 μ lに、所定量のAT-IIIを含む血漿検体を3、6、9 μ l及び10倍希釈した検体15 μ lをそれぞれ加え、5分間37℃で反応させ、次いで下記組成の第2試薬60 μ lを添加後、波長730 nmでの吸光度の1分間当りの増加速度（反応速度）を測定し、検体中のAT-III活性(%)と反応速度との関係を求めた。その結果を図2に示す。この図は、いわゆるAT-III活性測定の検量線を示しており、検体量が増加するに従って、測定範囲が狭くなっていることが判る。このように検体を希釈しないで測定しようとするれば、測定範囲が狭くなり不都合であることが判る。

合と同様な検量線が得られ、AT-IIIの広い濃度範囲にわたって測定できることが判る。

【0016】実施例3

検体量を3 μ lとし、第1試薬中にヤギ抗AT-III抗体を400 μ g/ml添加又は無添加で、実施例1と同様に反応速度を測定し、検体中のAT-III活性(%)と反応速度との関係を求めた。その結果を図4に示す。図中、●は本発明の方法（抗体添加）による測定結果を、○は従来法（抗体無添加）による測定結果を示す。図4に示されるように、抗体無添加では実施例1と同じく測定範囲が狭いが、抗体添加により、広い範囲でAT-IIIを測定できることが判る。

【図面の簡単な説明】

【図1】従来法において、検体中のAT-III濃度と残存酵素活性（反応速度）との関係を示す概念図である。

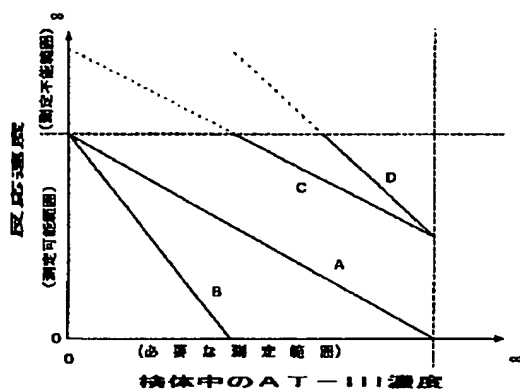
【図2】実施例1において、検体量を変化させた場合における検体中のAT-III活性と残存酵素活性（反応速度）との関係を示す図である。

【図3】実施例2における検体中のAT-III活性と残存酵素活性（反応速度）との関係を示す図である。図

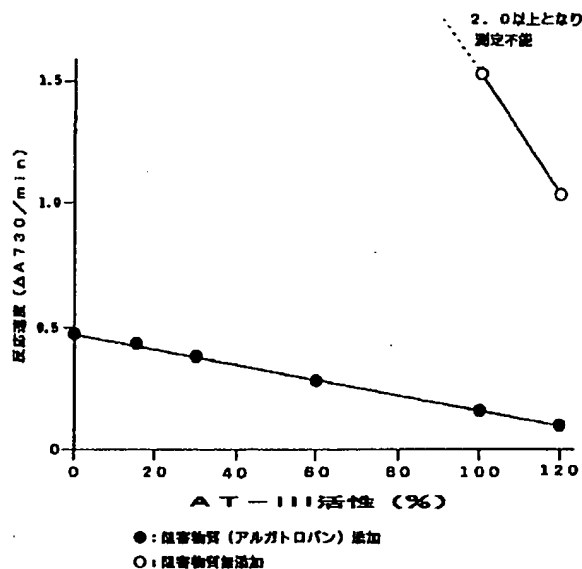
中、●は本発明の方法による測定結果を、○は従来法による測定結果を示す。

【図4】実施例3における検体中のAT-III活性と残存酵素活性（反応速度）との関係を示す図である。図中、●は本発明の方法による測定結果を、○は従来法による測定結果を示す。

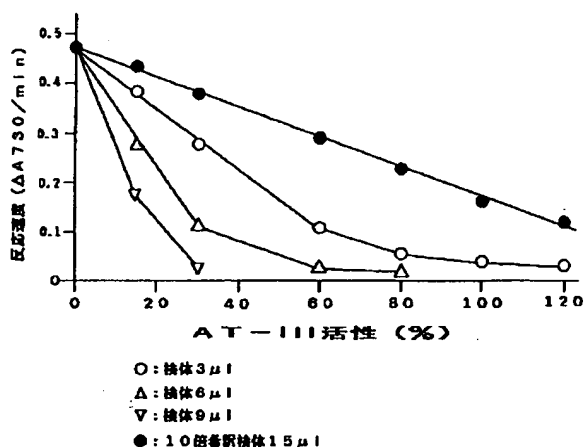
【図1】



【図3】



【図2】



【図4】

